УДК 619:541

Н.В Безгина, Л.Д Ничвеева, В.Е Козлов
ФГУП «Курская биофабрика»

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МЕМБРАННОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АЛЛЕРГЕНОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА

Введение

В настоящее время арсенал традиционных методов очистки и выделения биологически активных веществ пополнился мембранными методами. Исключающие применение химических реагентов и протекающие в щадящих условиях при температуре, благоприятной для биологически активных веществ, методы мембранной фильтрации позволяют существенно упростить технологический процесс производства, повысить качество готового продукта и снизить его потери. В отличие от традиционных приемов (осаждение, экстракция, адсорбция и т.п.) мембранная фильтрация происходит без фазовых переходов, что обеспечивает сохранение нативной структуры биомолекул [2].

Учитывая вышеизложенное, в целях повышения качества туберкулинов нами были проведены исследования по оценке методов мембранного фракционирования при очистке белков культуральной жидкости микобактерий, используемых в производстве аллергенов.

Материалы и методы

Ультрафильтрационное фракционирование аллергеновых препаратов осуществляли используя систему «Пелликон» на мембранах типа «OMEGA» (фирма «PALL») с номинально отсекаемой молекулярной массой (НОММ) 3 кДа, 10 кДа, 300 кДа.

Гель – хроматографическое разделение аллергенов проводили на колонках с ультрагелем АсА 34, АсА 44, используя хроматографическую систему «LKB».

Определение органических веществ проводили весовым способом.

Содержание белка в пробах определяли методом Къельдаля.

Реактогенность туберкулиновых фракций оценивали на морских свинках-альбиносах массой не менее 400 г (4). Интактным животным вводили дозы препарата содержащие 0,1 и 0,01 мг органического вещества. Уровень развития кожных реакций оценивали по диаметру эритем. Согласно требованиям МЭБ диаметр кожных реакций не должен превышать 5 мм.

Основные результаты

Эксперименты по применению методов мембранного фракционирования проводили в двух направлениях: концентрирование целевого продукта и удаление из аллергеновых препаратов реактогенных примесей.

Одной из наиболее распространенных стадий процесса промышленного производства диагностических препаратов является концентрирование белка. В опытах на кассетной системе «Пелликон» с мембранами, имеющими НОММ 10 кДа, было установлено, что при концентрировании культуральной жидкости выход белка достигал 90%. Селективность процесса концентрирования удалось повысить до 95-98% за счет использования кассетных установок с мембранами, имеющими НОММ 3 кДа. Высокий уровень селективности данного варианта мембран позволил предложить их использование при решении проблем, связанных с удалением низкомолекулярных примесей из переосажденных фракций туберкулинов. Этот вариант мембранного фракционирования – метод диафильтрации [1], может применятся при обессоливании раствора белка. Для удаления избытка соли к исходному раствору белка добавляли постадийно буферный раствор. После отбора определенной порции фильтрата, проходящего через ультрафильтрационные мембраны к диализуемому раствору белка, добавляли новую порцию буферного раствора. Объём необходимого количества буферного раствора составлял 8–10 объёмов раствора белка. Внедрение метода диафильтрации дало возможность значительно сократить потребление воды на этапе обессоливания концентрата белка по сравнению с традиционной технологией и что более важно при дальнейшей очистке – переводить белки препарата в любой требуемый буфер. Применение метода диафильтрации обеспечивало стан-

Таблица 1

Оценка реактогености фракций туберкулина очищенного (ППД) для птиц, полученных с применением мембранных методов

	Диаметр кожной реакции на введение фракций туберкулина (мм)			
	Высокомолекулярная фракция туберкулина очищенного (ППД) для птиц (НОММ более 300 кДа)		Туберкулин очищенный (ППД) для птиц, освобожденный от белков с НОММ более 300 кДа	
Доза введения (мг) / №№ свинок	**0,1**	**0,01**	**0,1**	**0,01**
1	12	-	7,0	-
2	9,5	4,5	-	-
3	9	-	-	-
4	12,5	6,5	13,5	-
5	5,5	-	-	-
6	10	-	-	-
Среднее (мм)	9,75	5,5	10,25	-

дартизацию молекулярной массы туберкулиновых аллергенов по нижней границе – в данном варианте 3 кДа.

Предварительные исследования по хроматографическому разделению фракций туберкулина, проведенные на крупномолекулярных гелях, показали неоднородность образцов. По молекулярной массе белки туберкулина разделялись на два пика. При исследовании их активности и специфичности установлено, что материал второго пика был более специфичен. Для оценки возможности снижения реактогенности туберкулина очищенного (ППД) для птиц было проведено мембранное разделение белков препарата. Раствор туберкулина очищенного (ППД) для птиц подвергали фракционированию в тангенциальном потоке на кассетах с НОММ 300 кДа, что позволяло стандартизовать белки туберкулина по верхней границе молекулярной массы [3]. Концентрат высокомолекулярной фракции промывали буферным раствором, используя метод диафильтрации. В таблице 1 представлены результаты оценки реактогенности фракций туберкулина очищенного (ППД) для птиц.

Как видно из данных таблицы 1 высокомолекулярная фракция туберкулина при введении в дозе 0,1 мг вызывала развитие кожных реакций у всех испытуемых животных, на дозу 0,01 мг реагировали 2 морские свинки. При введении животным туберкулина, содержащего белки с молекулярной массой меньше 300 кДа на дозу 0,1 мг, реагировало только 2 морские свинки из опытной группы, а доза 0,01 мг фракционированного туберкулина не вызывала развития кожных реакций.

В аналогично проведенных экспериментах по исследованию реактогенности туберкулинов очищенных (ППД) для млекопитающих было установлено, что препараты, содержащие высокомолекулярные фракции (НОММ больше 300 кДа), вызывали у интактных животных развитие кожных реакций диаметром 10 мм, в то время как соответствующая доза туберкулина очищенного (ППД) для млекопитающих, изготовленного с применением методов мембранного фракционирования и не имеющего в своем составе белков с НОММ более 300 кДа вызывала развитие кожных реакций диаметром менее 5 мм.

Выводы

Установлено, что применение методов мембранного фракционирования позволило повысить качественные показатели аллергенов применяемых при диагностике туберкулеза – туберкулина очищенного (ППД) для птиц и туберкулина очищенного (ППД) для млекопитающих. Удаление из препаратов высокомолекулярной фракции приводило к снижению их реактогенности. Ограничение антигенов туберкулинов по молекулярной массе (от 3 до 300 кДа) дало возможность обеспечить выпуск стандартных аллергодиагностикумов.

Литература

1. Агеев Е.П. Мембранные процессы разделения. / Агеев Е.П. // Крит. технол. Мембраны. 2001. № 9. С. 42-56.
2. Дубяга, В.П. Нанотехнологии и мембраны / Дубяга В.П., Бесфамильный И.Б. // Крит. технол. Мембраны. 2005. № 3. С. 11-16.

3. Козлов В.Е. Аллергены для диагностики туберкулеза: совершенствование производства и стандартизация: Автореф. дис. … докт. биол. наук: 03.00.23, 16.00.03/ Козлов В.Е.; Федеральное государственное учреждение «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов». М., 2007. 43 с.
4. OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Fifth Edition. 2004. Vol. 1. P. 723.

А.В. Бокарев, А.А. Стекольников, Е.А. Лаковников, М.Д. Спыну, О.Н. Суворов, Е.С. Соломатова
Санкт-петербургская академия ветеринарной медицины

ЦИТОМОРФОЛОГИЯ ВОСПАЛЕНИЙ ДИСТАЛЬНЫХ ОТДЕЛОВ КОНЕЧНОСТЕЙ У СОБАК (МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ)

Введение

Воспалительные заболевания в области пальцев и пясти (плюсны) у собак являются актуальной проблемой ветеринарной медицины. Характерной чертой проблемы является то, что воспаления данной локализации имеют склонность к хроническому течению с выраженной тенденцией к альтерации и экссудации (Рис. 1-а), а так же чрезвычайную устойчивость к традиционным средствам и методам медикаментозной терапии. Большая часть подобных воспалений (за исключением травм), по-видимому, носит идиопатический характер, т.е. их этиология не поддается определению.

Склонность к хроническому течению и отсутствие этиотропной терапии приводят к тому, что воспалительные процессы тканей в области пальцев у собак могут приобретать тяжелое, порой злокачественное течение, вследствие чего процесс воспаления не ограничивается только зоной первичной альтерации, но приобретает способность распространяться на близлежащие ткани, в том числе на костную ткань, суставы и сухожилья (Рис. 1-б, в). Пораженные ткани впоследствии могут замещаться грубой фиброзной тканью (Рис. 1-г), что в лучшем случае приводит к потере животным его экстерьерных качеств, а в худшем к необратимым нарушениям опорной функции конечности.

Поскольку, как уже было сказано выше, общего этиологического фактора для воспаления данной локализации не выявлено, а анализ анамнестических данных свидетельствует о том, что этих факторов может быть множество, как экзогенного так и эндогенного происхождения, следует принять допущение, что особенности течения воспаления данной локализации обусловлены не универсальным свойством фактора, вызывающего повреждение, а особенность цитохимического механизма самого воспалительного процесса.

Материалы и методы

1 – материал для исследования получен от 37 взрослых собак разных пород, находящихся на лечении в связи с поражениями пальцев и пясти (плюсны) воспалительного характера.

2 – препараты изготовлены методом мазков–отпечатков с участков поражения.

3 – Полученные препараты фиксировали в метаноле и окрашивали: для обычной обзорной светооптической микроскопии – красителем «Дифквик», для исследования уровня экспрессии аргентофильных белков – азотнокислым серебром по протоколу 10.2 [1], для люминесцентной микроскопии – акридиновым оранжевым.

4 – Исследование полученных препаратов проводили методом светооптической и флуоресцентной микроскопии на микроскопе «ЛЮМАМ И-1».

5 – Микрофотографирование изображений полученных цитологических препаратов проводили при помощи цифровой камеры «Micrometrics 300 CU».

6 – Документирование и обработку полученных изображений проводили на персональном компьютере при помощи программы «ScopePhoto 2.0.4»

Результаты исследования